

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/75180 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/045,
A61K 39/25, C12N 15/38, 15/63, G01N 33/68

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: KERN, Florian [DE/DE]; Wolliner Strasse 9,
D-10435 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01854

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmelde datum:
2. Juni 2000 (02.06.2000)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VOLK, Hans-Dieter [DE/DE]; Rathausstrasse 11, D-10178 Berlin (DE). REINKE, Petra [DE/DE]; Rathausstrasse 11, D-10178 Berlin (DE). FAULHABER, Nicole [DE/DE]; Fasanenstrasse 15, D-47509 Rheurdt (DE). SUREL, Ingolf-Pascal [DE/DE]; Marie-Curie-Allee 16, D-10315 Berlin (DE). KHATAMZAS, Elham [IR/DE]; Christburger Strasse 41, D-10405 Berlin (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PEPTIDES FOR VACCINATING AGAINST HUMAN CMV

(54) Bezeichnung: PEPTIDE ZUR VAKZINIERUNG GEGEN DAS HUMANE CMV

(57) Abstract: The invention relates to peptides which are optionally fragments of the IE-1 or pp65 protein selected from the following group having sequence R_N - Gln Thr Met Leu Arg Lys Glu Val Asn Ser Gln Leu Ser Leu Gly - R_C; R_N - Cys Asn Glu Asn Pro Glu Lys Asp Val Leu Ala Glu Leu Val Lys - R_C; R_N - Leu Val Lys Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val Arg His Arg - R_C; R_N - Ala Ala Asn Lys Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Lys Ala Arg Ala - R_C; R_N - Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu - R_C; R_N - Val Thr Ser Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser - R_C; R_N - Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser - R_C; R_N - Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile - R_C; R_N - Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn - R_C; R_N - Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile - R_C; R_N - His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly R_C; R_N - Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu Leu Cys Pro - R_C; R_N - Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe - R_C; R_N - Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly - R_C; R_N - Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Trp - R_C; R_N - Val Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile - R_C; R_N - Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gin Tyr - R_C; R_N - Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val - R_C; R_N - Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile - R_C; R_N - Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu - R_C; R_N - Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr - R_C; R_N - Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala - R_C; R_N Glu Asp Val Pro Ser Glu Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu Gly - R_C; R_N - Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu - R_C; R_N - Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu - R_C; R_N - Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu - R_C; R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Asp Glu Glu Ala Ile Val Ala Tyr Tyr Leu Ala Thr Ala Gly - R_C or R_N - Glu Asn Ser Asp Gln Glu Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Glu - R_C, whereby R_N represents -H or an amino protecting group; R_C represents -OH or a carboxyl protecting group. The inventive peptides are used in the preparation of a medicaments for vaccination against HCMV infections or a diagnostic reagent for identifying an immune response against HCMV.

A2

WO 00/75180

(57) Zusammenfassung: Peptide, die gegebenenfalls Fragmente des IE-1 oder pp65 Proteins sind, aus der folgenden Gruppe mit der Sequenz: R_N - Gln Thr Met Leu Arg Lys Glu Val Asn Ser Gln Leu Ser Leu Gly - R_C; R_N - Cys Asn Glu Asn Pro Glu Lys Asp Val Leu Ala Glu Leu Val Lys - R_C; R_N - Leu Val Lys Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val Arg His Arg - R_C; R_N - Ala Ala Asn Lys Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Lys Ala Arg Ala - R_C; R_N - Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu - R_C; R_N - Val Thr Ser Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser - R_C; R_N - Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser - R_C; R_N - Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile - R_C; R_N - Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn - R_C; R_N - Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile - R_C; R_N - His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly R_C; R_N - Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu Leu Cys Pro - R_C; R_N

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

- (84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

- Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe - R_C; R_N - Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly - R_C; R_N - Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Trp - R_C; R_N - Val Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile - R_C; R_N - Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr - R_C; R_N - Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val - R_C; R_N - Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile - R_C; R_N - Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu - R_C; R_N - Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr - R_C; R_N - Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala - R_C; R_N Glu Asp Val Pro Ser Glu Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu Gly - R_C; R_N - Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu - R_C; R_N - Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu - R_C; R_N - Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu - R_C; R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr - R_C; R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Asp Glu Glu Ala Ile Val Ala Tyr Tyr Leu Ala Thr Ala Gly - R_C oder R_N - Glu Asn Ser Asp Gln Glu Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Glu - R_C dabei steht R_N für -H oder eine Amino-Schutzgruppe; R_C für -OH oder eine Carboxyl- Schutzgruppe. Die erfindungsgemäßen Peptide werden zur Herstellung eines Medikaments zur Vakzinierung gegen HVMV-Infektionen oder eines Diagnostikums zur Identifizierung einer Immunantwort gegen HCMV verwendet.

Peptide zur Vakzinierung gegen das humane CMV

- Die Erfindung betrifft Peptide oder Peptidderivate, die zur Vakzinierung gegen das
5 humane Cytomegalievirus (HCMV) geeignet sind oder zur Diagnostik bei Patienten,
wobei untersucht werden kann, ob diese Patienten eine Immunantwort gegen HCMV
aufbauen oder aufgebaut haben.
- 10 Die humanen Cytomegalieviren (HCMV) bilden eine Gruppe artverwandter Viren, die zu
den Herpes Viren zählen. (Lutz SCHNEIDER, 1990, Pharmazie, Vol. 135 Nr. 27, 2396 -
2400). Nach einer Erstinfektion verbleiben die Viren latent im Körper. Physischer oder
psychischer Stress können zur Reaktivierung von latenterem HCMV führen. Das Virus ist
15 ubiquitär. Die Durchseuchung der Population liegt in Mitteleuropa bei 65%. Die
zellvermittelte Immunantwort spielt bei der Kontrolle und der Abwehr gegen die HCMV
– Infektion eine wesentliche Rolle. Wurden HCMV spezifische CD8⁺ T Zellen von einem
Spender auf einen Patienten, der an HCMV leidet, übertragen, so konnte eine
20 Immunantwort gegen die HCMV – Infektion beobachtet werden. (P.D. GREENBERG et
al., 1991, Development of a treatment regimen for human cytomegalovirus (CMV)
infection in bone marrow transplantation recipients by adoptive transfer of donor –
derived CMV – specific T cell clones expanded in vitro. ANN. N. Y. Acad. Sci., Vol.:
25 636, pp 184 – 195). Unglücklicher sind nur wenige Epitope des HCMV bekannt, welche
spezifisch von CD8⁺ T Zellen erkannt werden. Es wird angenommen, daß die
Immunantwort wesentlich durch das 55KD Immediate-Early-Protein 1 (IE-1) und das
65KD Lower-Phospho-Matrix-Protein (pp65) dominiert wird (N.J. ALP et al., 1991, Fine
30 specificity of cellular immune responses in humans to human cytomegalovirus
immediate – early 1 protein, J. Virol., Vol: 65, pp 4812 – 4820; und E.H. McLAUGHLIN
– TAYLOR et al., 1994, Identification of the major late human cytomegalovirus matrix
protein pp65 as a target antigen for CD8⁺ virus – specific cytotoxic T lymphocytes, J.
Med. Virol., Vol.: 43, pp 103 – 110; und weiter, M. WILLS et al. ,1996, The human
cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural
protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL, J.
Virol. 1996, Vol. 70, pp7569-79).

Die Infektion verläuft bei Erwachsenen mit einem funktionstüchtigen Immunsystem unauffällig und zeigt höchstens unspezifische Symptome, wie Abgeschlagenheit und leicht erhöhte Körpertemperatur. Bei immungeschwächten Erwachsenen stehen bei HCMV - Infektionen pulmonale Erkrankungen und Netzhaut-Entzündungen im Vordergrund. Bei AIDS-Patienten verursachen CMV-Infektionen zahlreiche Todesfälle.

Verschiedene Substanzen werden zur Behandlungen gegen das Cytomegalievirus eingesetzt. Foscarnet z.B. ist eine antivirale Substanz mit in Zellkulturen nachgewiesener selektiver Aktivität gegen humane Herpes-Viren, wie zum Beispiel Herpes simplex, Varicella zoster, Epstein-Barr und Cytomegalie-Viren, sowie Hepatitis Viren. Die antivirale Wirkung beruht auf einer Hemmung viraler Enzyme, wie DNA-Polymerasen und reversen Transkriptasen. Auf Cytomegalieviren wirkt Foscarnet virostaticisch, jedoch können die Viren nicht eliminiert werden (Lutz SCHNEIDER, 1991, Neue Arzneistoffe, Vol 136, Nr. 46). Eine weitere Problematik der Cytomegalievirus-Infektion stellt die Notwendigkeit der bisweilen lebenslangen Dauerbehandlung der Patienten dar (insbesondere bei AIDS). Nachteilig ist weiterhin, daß die Cytomegalieviren in den letzten Jahren resistenter gegen die üblicherweise verwendeten antiviralen Substanzen geworden sind (z.B. Stanat et al., 1991, Antimicrob. Agents, Chemother. Vol 35, Nr. 11: 2191 - 2197 und Knox et al., 1991, Lancet, Vol 337: 1292 - 1293).

Die Sequenz von des 55KD Immediate-Early Protein 1 (IE-1) ist beschrieben und definiert in A. AKRIGG, G.W.G. WILKINSON, J.D. ORAM (1985) The structure of the major immediate early gene of human cytomegalovirus strain AD169, Virus. Res., 2:107-121. Die Sequenz des 55KD Immediate-Early Protein 1 ist in der SWISS-PROT Datenbank, European Bioinformatics Institute, unter der Nummer P13202 (=primary accession number) abgelegt. Das 65 KD Lower-Matrix- Phosphoprotein (pp65) wurde beschrieben in B. RUEGER, S. KLAGES, B. WALLA et al. (1987) Primary structure and transcription of the genes coding for the two virion phosphoproteins pp65 and pp71 of human cytomegalovirus, J. Virol. 61:446 – 453. Die Sequenz des 65 KD Lower Matrix Phosphoprotein ist in der SWISS-PROT Datenbank, European Bioinformatics Institute, unter der Nummer P06725 (=primary accession number) abgelegt. Die Sequenzen beider Proteine sind beschrieben in M.S. CHEE, A.T. BANKIER, S. BECKS et al. (1990) Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 154:125 – 169.

3

Aufgabe der Erfindung ist das Anbieten von Peptiden oder deren Derivaten, die die Produktion von Interferon- γ oder Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) in CD8 $^{+}$ T Zellen, insbesondere von mit HCMV immunisierten Personen mit geeignetem HLA-Typ, induzieren. Diese Peptide und deren Derivate sind als Mittel zur Vakzinierung geeignet.

Ebenso sind sie zur Diagnostik geeignet, um feststellen zu können, ob bei einer Person eine gegen HCMV gerichtete zelluläre Immunantwort vorhanden ist, und um diese zu quantifizieren.

Die Aufgabe wird gelöst durch Peptide oder Peptidderivate davon, aus der folgenden Gruppe mit der Sequenz:

- R_N - Gln Thr Met Leu Arg Lys Glu Val Asn Ser Gln Leu Ser Leu Gly - R_c
R_N - Cys Asn Glu Asn Pro Glu Lys Asp Val Leu Ala Glu Leu Val Lys - R_c
R_N - Leu Val Lys Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val Arg His Arg- R_c
R_N - Ala Ala Asn Lys Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Lys Ala Arg Ala - R_c
R_N - Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met- R_c
R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met- R_c
R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu- R_c
R_N - Val Thr Ser Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser- R_c
R_N - Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser- R_c
R_N - Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile- R_c
R_N - Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn - R_c
R_N - Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile - R_c
R_N - His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly - R_c
R_N - Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu Leu Cys Pro- R_c
R_N - Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe- R_c
R_N - Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly - R_c
R_N - Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Trp- R_c
R_N - Val Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile- R_c
R_N - Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr- R_c
R_N - Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val- R_c
R_N - Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile - R_c
R_N - Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu - R_c
R_N - Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr- R_c
R_N - Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala - R_c
R_N - Glu Asp Val Pro Ser Glu Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu Gly - R_c
R_N - Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu - R_c

R_N - Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu - R_C

R_N - Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu - R_C

R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C

R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr - R_C

5 R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C

R_N - Asp Glu Glu Ala Ile Val Ala Tyr Tyr Leu Ala Thr Ala Gly - R_C

oder

R_N - Glu Asn Ser Asp Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Glu - R_C

dabei steht

10 R_N für -H oder eine Amino - Schutzgruppe oder mindestens eine weitere Aminosäure außerhalb des Peptids oder Peptidderivats,

R_C für -OH oder eine Carboxyl - Schutzgruppe oder mindestens eine weitere Aminosäure außerhalb des Peptids oder Peptidderivats,

wobei die Peptid - Derivate eine Deletion, Insertion oder Substituierung von ein, zwei

15 oder drei Aminosäuren der zuvor genannten Sequenzen aufweisen, oder

die Sequenz bis auf neun zusammenhängende Aminosäuren gekürzt wird, wobei die Deletion N - terminal und / oder C - terminal ist,

wobei die Peptidderivate im wesentlichen die Funktion eines der zuvor ausdrücklich aufgeführten Peptide

20 Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu

Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu

Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu

Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr

25 Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

Gln Thr Met Leu Arg Lys Glu Val Asn Ser Gln Leu Ser Leu Gly

Cys Asn Glu Asn Pro Glu Lys Asp Val Leu Ala Glu Leu Val Lys

Leu Val Lys Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val Arg His Arg

Ala Ala Asn Lys Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Lys Ala Arg Ala

30 Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu

Val Thr Ser Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser

Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser

35 Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile

Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn

5

Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile
His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly
Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu Leu Cys Pro
Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe
Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly
Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Trp
Val Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile
Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr
Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val
Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile
Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu
Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr
Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala
Glu Asp Val Pro Ser Glu Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu Gly
Asp Glu Glu Ala Ile Val Ala Tyr Tyr Leu Ala Thr Ala Gly

10 oder

Glu Asn Ser Asp Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Glu
(jede der vorherigen Sequenzen = Referenzsequenz)

besitzen, in CD8⁺ T Zellen, insbesondere von mit HCMV immunisierten
Personen mit geeignetem HLA-Typ, die Produktion von Interferon-γ oder TNF-
α zu induzieren.

Ein geeigneter HLA – Typ (Human Leukocyte Antigen) ist eine Kombination von MHC –
Klasse I Molekülen (Major Histocompatibility Complex), von denen eines oder mehrere
25 die Präsentation der beschriebenen Peptide ermöglichen. Nur wenn ein geeigneter HLA
– Typ vorliegt, kann ein bestimmtes Peptid auch präsentiert werden, und nur dann kann
es zur Stimulation kommen. Geeignete Referenz für den MHC an sich und die
Antigenerkennung von T Zellen: Abdul K. ABBAS Cellular and Molecular Immunology /
A.K. Abbase A.H. Lichtman, J.S. Prober, Chapter 5 and 6, 1991, W.B. SAUNDERS,
30 Philadelphia, ISBN 0-7216-3032-4

Viele Patienten, die eventuell vakziniert werden können, sind bereits infiziert. Bei diesen
Patienten handelt es sich somit um eine Verstärkung der Immunantwort ("Booster").
Die Infektion kann latent sein oder aktiv auftreten. Auch Personen mit latenter Virus
35 sind als „infiziert“ anzusehen.

Bevorzugte Referenzsequenzen sind

Val Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile;

Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val;

Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Thr Ser;

5 Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu.

Die einzelnen Aminosäuren haben in den jeweiligen Positionen unterschiedliche Bevorzugung.

Der Vergleich der verschiedenen Aminosäuren erfolgt durch Austausch einer 10 Aminosäure in einer definierten Position bei gleichzeitiger Beibehaltung der anderen Aminosäuren in den restlichen Positionen. Generell sind auch mehrfache Substituierungen möglich.

Die Funktionen der Peptide oder Peptidderivate werden wesentlich verändert, wenn 15 Substituenten gewählt werden, die bei der Substituierung weniger konservativ als die im folgenden erwähnten Aminosäuren sind. So sind die Substituenten Gly und Ser der Aminosäure Ala ähnlich, weiterhin ist der Substituent Lys der Aminosäure Arg ähnlich. Die Substituenten Gin und His sind der Aminosäure Asn ähnlich, der Substituent Glu ist der Aminosäure Asp ähnlich, der Substituent Ser ist der Aminosäure Cys ähnlich, der 20 Substituent Asn ist der Aminosäure Gln ähnlich, der Substituent Asp ist der Aminosäure Glu ähnlich, der Substituent Thr ist der Aminosäure Ser ähnlich, der Substituent Ser ist der Aminosäure Thr ähnlich, der Substituent Tyr ist der Aminosäure Trp ähnlich, die Substituenten Ala und Pro sind der Aminosäure Gly ähnlich, die Substituenten Asn und Gln sind der Aminosäure His ähnlich, die Substituenten Leu und Val sind der 25 Aminosäure Ile ähnlich, die Substituenten Ile und Val sind der Aminosäure Leu ähnlich, die Substituenten Arg, Gln und Glu sind der Aminosäure Lys ähnlich, die Substituenten Leu, Tyr und Ile sind der Aminosäure Met ähnlich, die Substituenten Met, Leu und Tyr sind der Aminosäure Phe ähnlich, die Substituenten Trp und Phe sind der Aminosäure Tyr ähnlich, und die Substituenten Ile und Leu sind der Aminosäure Val ähnlich.
30 Derartige wesentlichen Veränderungen lassen sich durch Substituierungen mit Aminosäuren erzielen, die sich mehr in ihrer Struktur und in den funktionellen Gruppen unterscheiden. Wesentliche Veränderungen wirken sich dahingehend aus, daß die dreidimensionale Struktur deutlich verändert wird und/oder daß zum Beispiel die Faltblatt - Struktur oder die helikale Struktur beeinflußt wird. Auch Wechselwirkungen 35 der Ladungen und der hydrophoben Ketten sind bei den Veränderungen zu beachten.

Derartige Analysen über Substituierungen lassen sich leicht bewerkstelligen. Dabei wird je eine Aminosäure in einer Position gegen bevorzugt Alanin oder eine weitere Aminosäure ausgetauscht. Nach der Synthese des modifizierten Proteins wird die 5 Funktion des veränderten Peptids gemessen. Die Funktionen und deren Messung sind in den Beispielen dargestellt. Auch mehrfache Substituierungen sind möglich.

Definitionen

- 10 Die im Text verwendeten **Abkürzungen** sind durch die Regeln bestimmt, die von der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur festgelegt worden sind (Biochemistry 11: 1726 (1972) und Biochem. J. 219: 345 (1984)). Folgende übliche Abkürzungen werden verwendet: Ala = A = Alanin; Arg = R= Arginin; Asn =N = Asparagin; Asp = D = Asparaginsäure; Cys = C = Cystein; Gln = Q = Glutamin; Glu = E = Glutaminsäure; Gly = G = Glycin; His = H = Histidin; Ile = I = Isoleucin; Leu = L = Leucin; Lys = K = Lysin; Met = M = Methionin; Phe = F = Phenylalanin; Pro = P = Prolin; Ser = S = Serin; Thr =T = Threonin; Trp = W = Tryptophan; Tyr = Y = Tyrosin und Val = V = Valin.
- 20 Die **Schutzgruppe** des Restes R_N kann bestehen aus:
Alkyl-, Aryl-, Alkylaryl-, Aralkyl-, Alkylcarbonyl- oder Arylcarbonylgruppen mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, bevorzugt sind Naphthoyl-, Naphthylacetyl-, Naphthylpropionyl-, Benzoylgruppe oder einer Acylgruppe mit 1 bis 7 Kohlenstoffatomen.
Die **Schutzgruppe** des Restes R_C kann bestehen aus:
25 Eine Alkoxy- oder Aryloxygruppe mit 1 bis 10 Kohlenstoffatomen oder aus einer Aminogruppe.
Weitere **Schutzgruppen** - sowohl für R_N und R_C - sind in Houben-Weyl (1974) Georg Thieme Verlag, 4. Auflage beschrieben. Die Beschreibung der Schutzgruppen in der zitierten Literaturangabe ist Teil der Offenbarung.
- 30 Die Sequenz der erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate kann am N-terminalen und/oder C-terminalen Ende an Stelle einer Schutzgruppe mit weiteren **Rahmen-Aminosäure-Sequenzen** verbunden sein. Diese weiteren Rahmen-Aminosäure-Sequenzen sind für die Funktion der erfindungsgemäßen Peptide oder 35 Peptidderivate nicht wesentlich, sie können jedoch Träger von anderen Funktionen sein, so zum Beispiel enzymatische Funktionen umfassen. Derartige Rahmen -

Aminosäure - Sequenzen treten in der Natur auf. Es kann sich dabei zum Beispiel um die zwischen den hypervariablen Bereichen angeordneten Sequenzen des variablen Bereichs eines Antikörpers handeln. Diese Sequenzen werden als "Frame-Work" (Rahmensequenzen) bezeichnet. Als Rahmen – Aminosäure - Sequenzen sind weiterhin nicht abgespaltene Signalsequenzen eines sezernierten eukaryontischen Proteins bekannt, wobei das Protein in einem Bakterium exprimiert wird. Derartige Signalsequenzen haben bisweilen keinen Einfluß auf die Funktion des nachfolgenden Proteins. Ebenfalls ist es möglich, erfindungsgemäße Peptide oder Peptidderivate hintereinander zu koppeln, wobei Rahmen – Aminosäure - Sequenzen zwischen den Einzelsequenzen angeordnet sind. Ebenfalls sind Fusionsproteine bekannt, bei denen am N-terminalen oder am C-terminalen Ende das Peptid peptidisch gebunden ist. Ein solches Fusionsprotein ist von Bakterien oder eukaryontischen Zellen exprimierbar.

Um im Einzelfall zu entscheiden, ob ein bestimmtes erfindungsgemäßes Peptid oder Peptidderivat mit wenigstens einer Rahmen – Aminosäure - Sequenz und / oder wenigstens einer Schutzgruppe zum Gegenstand der Erfindung zählt, ist ein Vergleich zwischen

- (i) diesem Peptid oder Peptidderivat mit Rahmen-Aminosäure-Sequenz und / oder mit Schutzgruppe und
 - (ii) demselben Peptid oder Peptidderivat ohne Rahmen-Aminosäure-Sequenz und ohne Schutzgruppe
- anzustellen. Dabei sollten beide Moleküle im wesentlichen dieselbe Funktion wie die Peptide aus der Gruppe der Referenzsequenzen besitzen, in CD8⁺ T Zellen, insbesondere von mit HCMV immunisierten Personen mit geeignetem HLA-Typ, die Produktion von Interferon-γ oder TNF-α zu induzieren.

Die aufgeführten **Aminosäuren** sind natürliche oder künstliche Aminosäuren. Die künstlichen Aminosäuren sind in Houben-Weyl (1974) Georg Thieme Verlag, 4. Auflage beschrieben. Dabei ist der Austausch einer beschriebenen Aminosäure durch eine weitere Aminosäure, die zur Gruppe der natürlichen oder künstlichen Aminosäuren gehört, leicht möglich. Aufgrund des Testsystems und Vergleichs mit einem der zuvor ausdrücklich aufgeführten Peptide aus der Gruppe der Referenzsequenzen ist es leicht möglich, herauszufinden, ob eine Wirkung vorliegt, die gleich oder ähnlich der Wirkung der gefundenen erfindungsgemäßen Substanzen ist. Unter den Schutzzumfang fallen auch alle D-

9

Aminosäuren und alle Aminosäuren, die künstlich herstellbar sind. (Houben-Weyl). Für den Fachmann ist es ein leichtes, unter Beibehaltung der Funktionen, die im Test überprüfbar sind, die molekulare Struktur unter Beibehaltung der wesentlichen Bausteine abzuwandeln. Auch diese funktionell 5 gleichwirkenden Moleküle fallen unter den Begriff der Peptidderivate.

Vorteile

Die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate ermöglichen es, gezielt Vakzinen 10 gegen eine Infektion mit humanen Cytomegalievirus herzustellen. Auch können die Peptide und Peptidderivate als Diagnostika verwendet werden, um zu sehen, ob die zu untersuchenden Patienten, insbesondere solche mit geeignetem HLA-Typ, CD8+ T Zellen besitzen, die durch die erfindungsgemäßen Substanzen zur Produktion von Interferon- γ oder TNF- α (Tumor - Nekrose - Faktor alpha) induziert werden.

15

Bevorzugte Ausführungsformen

Bevorzugt sind Nonamere, die darin bestehen, daß eine längere Sequenz, wie sie zuvor ausdrücklich genannt worden ist oder deren Derivate bis auf neun 20 zusammenhängende Aminosäuren gekürzt werden. Dabei kann die Deletion N – terminal und / oder C – terminal sein. Wesentlich ist dabei, daß die Funktion von einem Peptid aus der Gruppe der Referenzsequenzen im Wesentlichen erfüllt wird. Daß Nonamere sehr potente Stimulatoren von CD8+ T Zellen sind, ist dadurch bedingt, das MHC – Klasse I präsentierte Peptide typischer Weise eine Länge von neun 25 Aminosäuren aufweisen. (K.O. FALK et al. (1991) Allele – specific motifs revealed by sequencing of self – peptides eluted from MHC molecules, Nature, Vol.: 351, pp 290 – 296 und H.G. RAMMENSEE et al. (1999) An Internet Database for MHC Ligands and Peptide Motifs, <http://134.296.221/scripts/hlaserver.dll/home.htm>)

30 Ebenso ist es möglich, die zuvor genannten Nonamere mit weiteren Aminosäuren peptidisch zu verbinden, so daß Sequenzen von mindestens 10 Aminosäuren entstehen. Diese Sequenzen haben ebenfalls die Funktion, in CD8+ T Zellen die Produktion von Interferon- γ oder TNF- α zu induzieren. Somit zählen zum Schutzmfang der Erfindung auch die um mindestens eine Aminosäure verlängerten 35 Sequenzen von Nonameren, welche die Funktion aufweisen, in CD8+ T Zellen,

10

insbesondere von mit HCMV immunisierten Personen mit geeignetem HLA-Typ, die Produktion von Interferon- γ oder TNF- α zu induzieren. Für die verlängerten Nonamere ist wesentlich, daß sie ebenfalls die Funktion besitzen, in CD8 $^{+}$ T Zellen, insbesondere von mit HCMV immunisierten Personen mit geeignetem HLA-Typ, die Produktion von 5 Interferon- γ oder TNF- α zu induzieren.

Herstellung der Peptide

Weiterhin sind die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate leicht herstellbar. 10 Derart kurze Peptide oder Peptidderivate können mittels einer Technik hergestellt werden, die den Fachleuten im Bereich der Peptidsynthese bekannt ist. Eine Zusammenfassung vieler dieser Techniken können bei J.M. STEWART and J.D. YOUNG, San Francisco, 1969; und J. MEIERRHOFER, Hormonal Proteins and Peptides, Vol. 2 p 46, Academic Press (New York), 1973 für die Festphasen-Methode 15 und E. SCHRODER and K.LUBKE, The Peptides, Vol. 1, Academic Press (New York) 1965 für die Flüssigphasen-Methode nachgelesen werden. Die Schritte der Synthese sind in den EP-A 0 097 031 beschrieben. Die allgemeinen Verfahrensschritte aus den europäischen Publikationen lassen sich analog auf die Synthese der hier beschriebenen erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate übertragen. Weitere 20 Literatur zu der Festphasensynthese sind: Solid Phase Synthesis, E. ATHERTON and R.C. SHEPPARD (1989) IRL Press, ISBN 1-85221-133-4 and Amino Acid and Peptide Synthesis, J. JONES, Oxford Science Publication (1992) ISBN 0-19-855668-3.

Weitere Ausführungsformen bezüglich der Reste

25 Neben der Abwandlung der Aminosäure-Sequenz der erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate ist auch eine Variation der Reste R_N und R_C möglich. Die Reste brauchen jedoch die Funktion nicht zu beeinflussen. Dennoch lassen sich durch Schutzgruppen Parameter wie Stabilität, pH-Abhängigkeit, biologische Abbaubarkeit 30 und Interaktionen mit dem nativen Teil des Fusionsproteins deutlich beeinflussen.

Bevorzugt sind erfindungsgemäße Peptide oder Peptidderivate, bei denen der Rest

R_N für -H oder eine Amino-Schutzgruppe

und

35 R_C für -OH oder eine Carboxyl-Schutzgruppe steht.

11

Bevorzugter sind erfindungsgemäße Peptide oder Peptidderivate, bei denen die Reste stehen:

R_N für -H oder eine Acylgruppe

und

5 R_C für -OH oder Amino-Gruppe.

Am meisten bevorzugt sind erfindungsgemäße Peptide oder Peptidderivate, bei denen die Reste stehen:

R_N für -H

und

10 R_C für -OH.

Herstellungsverfahren der erfindungsgemäßen Peptide

Die Erfindung umfaßt weiterhin die Herstellung der erfindungsgemäßen Peptide oder 15 Peptidderivate, wobei eine N- α geschützte ω -Amino- α -aminoäure mit einem Dialdehyd in Gegenwart eines Reduktionsmittels umgesetzt und anschließend die Schutzgruppen der Seitenketten und gegebenenfalls die Schutzgruppen des N-Terminus und/oder des C-Terminus abgespalten werden.

20 Ebenfalls umfaßt die Erfindung ein Verfahren, bei dem die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate hergestellt werden, indem die Aminosäuren in einer homogenen Phase oder nach der Festphasen - Methode kondensiert werden,

wobei das Carboxyl - Ende einer zu koppelnden Aminosäure, deren Aminogruppen und 25 gegebenenfalls funktionellen Gruppen der Seitenkette eine Schutzgruppe tragen, mit dem freien Amino - Ende der zu koppelnden Aminosäure oder des zu koppelnden Peptids in Gegenwart eines Kondensationsreagenzes reagiert,

und

im Falle einer nicht-endständigen Aminosäure anschließend die α -Amino-Schutzgruppe der gekoppelten Aminosäure abgespalten wird und weitere 30 Aminosäuren an die zu synthetisierende Peptid-Kette nach den zuvor beschriebenen beiden Schritten gekoppelt werden

oder

im Falle einer endständigen Aminosäure gegebenenfalls anschließend die α -Amino-Schutzgruppe der gekoppelten Aminosäure abgespalten wird

35 und

12

nach Kopplung der letzten Aminosäure im Falle der Festphasen-Methode das Peptid oder Peptidderivat von der Festphase abgespalten wird.

5

Verwendung als Medikament

Die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate sind geeignet als Medikament oder Diagnostikum eingesetzt zu werden.

- 10 Am meisten bevorzugt ist die Verwendung eines Peptids oder Peptidderivates zur Herstellung eines Medikaments zur Vakzinierung gegen das humane Cytomegalievirus.

Ebenfalls vorteilhaft ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Peptids oder Peptidderivates zur Herstellung eines Diagnostikums zur Identifizierung einer zellulären

- 15 Immunantwort gegen HCMV. Dabei können T-Zellen des Patienten in vitro mit den erfindungsgemäßen Peptiden und Peptidderivaten stimuliert werden. Wird dabei die Interferon- γ oder TNF- α Produktion in CD8 $^{+}$ T Zellen induziert, so ist eine Immunantwort gegen HCMV nachgewiesen. Führt diese Stimulation nicht zur Induktion von Interferon- γ oder TNF- α in CD8 $^{+}$ T-Zellen einer mit HCMV immunisierten Person
20 mit geeignetem HLA-Typ, kann dies bedeuten, daß diese Person keine CD8 $^{+}$ T-Zellantwort gegen das HCMV aufgebaut hat oder eine bestehende CD8 $^{+}$ T-Zellantwort sich nicht gegen das zur Stimulation verwendete Epitop richtet.

Besonders vorteilhaft ist der Einsatz eines erfindungsgemäßen Peptids oder Peptidderivates zur Herstellung eines Diagnostikums zur Identifizierung einer Immunantwort gegen HCMV bei immungeschwächten Personen.

Die mittels der Induktion von INF- γ oder TNF- α in CD8 $^{+}$ T-Zellen identifizierte Immunantwort gegen HCMV, kann quantifiziert werden, indem die Anzahl der CD8 $^{+}$ T-Zellen bestimmt wird, in welchen es zur Induktion dieser Zytokine gekommen ist. Diese Anzahl kann absolut (pro Volumen des Ausgangsmaterials) oder relativ (bezogen auf beispielsweise alle CD8 $^{+}$ T-Zellen) angegeben werden. Diese Quantifizierung kann beispielsweise durchflußzytometrisch oder mittels eines geeigneten anderen Verfahrens erfolgen.

13

Als Medikament sind die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate bevorzugt, wenn sie eine Zusammensetzung mit pharmakologisch verträglichen Hilfs- und Trägerstoffen bilden. Derartige Hilfs- und Trägerstoffe sind in Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed. Mack Publishing Company, East Pennsylvania 5 (1980) beschrieben. Die Zusammensetzungen können nach bekannten Verfahren hergestellt werden.

Vorteilhaft ist die Verwendung der Peptide oder Peptidderivate, wenn Sie zum Beladen dendritischer Zellen verwendet werden, welche anschließend einem Patienten als 10 Medikament verabreicht werden. Vorteilhafter ist es, wenn die Peptide oder Peptidderivate zum Beladen HLA-identischer oder -teilidentischer dendritischer Zellen verwendet werden, welche anschließend einem Patienten als Medikament verabreicht werden.

15 Die Verwendung von peptidbeladenen dendritischen Zellen als Vakzine wird bei Brugger et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 872, pp 363-371, beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate besitzen pharmakologische Eigenschaften und sind deshalb als pharmazeutischer Wirkstoff oder Diagnostikum, 20 insbesondere als Vakzine oder Diagnostikum verwendbar. Die Erfindung umfaßt ebenfalls ein Arzneimittel, das die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate enthält.

25 Die Versuchsergebnisse der *in vitro* Testung zeigen, daß die erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate als Arzneimittel oder zur medizinischen Behandlung verwendet werden können. Diese Versuchsergebnisse lassen sich von dem *in vitro* Testsystem auf ein *in vivo* System problemlos übertragen.

Die Erfindung liefert weiterhin

- 30 (i) die Verwendung von erfindungsgemäßen Peptiden oder Peptidderivaten (zur Herstellung eines Medikaments) als Vakzine gegen Infektionen mit HCMV;
(ii) eine pharmakologische Zusammensetzung als Vakzine gegen Infektionen des HCMV, welche als Behandlung oder Prophylaxe die erfindungsgemäße Peptide oder Peptidderivate und wenigstens einen pharmazeutischen Hilfs- und / oder Trägerstoff
35 umfaßt.

14

Für die therapeutische Wirkung sind unterschiedliche Dosen geeignet. Sie hängen beispielsweise von den verwendeten Salzen, vom Wirt, von der Art der Verabreichung und von der Art und der Schwere der zu behandelnden Zustände ab.

- 5 Auch sind Kombinationen der erfindungsgemäßen Peptide oder Peptidderivate möglich.

Die Erfindung umfaßt weiterhin DNA (Desoxyribonucleic acid = Desoxyribonucleinsäure), welche für eine der zuvor genannten Aminosäuresequenzen und deren Derivate kodiert.

- 10 Diese DNA kann sinnvoller Weise in Vektoren oder Plasmide eingebaut sein. Solche Vektoren sind geeignet, in menschliche Zellen einzudringen und dort mit der Proteinbiosynthese zu beginnen. In dieser Form kann der Proteinbiosynthese – Apparat des Menschen verwendet werden, um die gewünschten Peptide zu synthetisieren und zu sezernieren.
- 15 Derartige Vektoren werden mit anders kodierenden DNA beschrieben in D. Salmon-Ceron et al. (1999) AIDS Res Hum Retroviruses Vol 15/7, pp 633 – 645 und F. DORNER et al. (1999) Ann Med. Vol 31/1, pp 51 – 60 und G. FERRARI et al. (1997) Blood, Vol 90, pp 2406 – 2416 und K. MOLLING (1998) Z. Arztl. Fortbild. Qualitätssich Vol 92, pp 681 – 683 und M. Giese (1998), Virus Genes Vol 17, pp 219 - 232

20

15

Beispiele

Methoden

Mit Zitrat versetztes Blut wurde von anti-HCMV-IgG-seropositiven Blutspendern erhalten, die einen definierten HLA – Typ besitzen. Es folgte eine Ficoll – Paque Dichte Zentrifugation. Die Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen. Sie wurden in RPMI 1640 resuspendiert, welches 0,1 % BSA und 2 mM Glutamin enthielt. Die Zellen wurden auf 10^7 Zellen pro ml eingestellt. 200 μ l der Zell - Suspension und der Peptid - Lösung (10 μ g pro ml in RPMI / BSA) wurden in Cellstar^R Polystyren – Röhrchen gefüllt und in einem Inkubator gelagert.

- Nach einer Stunde wurden 1600 μ l RPMI 1640 hinzugegeben, welches 12,5% FCS, 50 mM Glutamin und 12,5 μ g pro ml Brefeldin A enthielt. Nach fünf weiteren Stunden wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, resuspendiert in PBS, mit 1 mM EDTA, inkubiert für 10 weitere Minuten bei 37 °C und erneut mit kaltem PBS gewaschen.
- Nach einer Oberflächenmarkierung mit monoklonalen Antikörpern über 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen in PBS, das 4 % Paraformaldehyd enthielt, über 4 Minuten bei 37 °C fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mittels der Permeabilisierungslösung von Becton Dickinson (Heidelberg) permeabilisiert und anschließend nochmals mit PBS gewaschen.
- Im Anschluß an die folgende intrazelluläre Markierung mit monoklonalen Antikörpern gegen Interferon- γ und/oder TNF- α wurden die Zellen erneut in PBS gewaschen und mit einem FACScalibur^R Durchfluß – Zytometer (Becton Dickinson) unter Verwendung einer CellQuestTM Software analysiert. Nicht stimulierte Proben wurden als Kontrolle eingesetzt.

25

Ergebnisse:

Die erfindungsgemäßen Substanzen zeigten eine Stimulierung der CD8 $^{+}$ T Zellen. Diese Substanzen sind daher als Vakzine geeignet. Weiterhin sind sie geeignet, als Diagnostikum eingesetzt zu werden, wobei die Zellen identifiziert werden, die auf HCMV reagieren können. Die Unfähigkeit oder Fähigkeit eines Patienten, auf HCMV reagieren zu können, oder eine bereits stattgefundene Immunisierung mit HCMV werden durch diese Form der Diagnostik festgestellt. Die Stimulierung der CD8 $^{+}$ T Zellen wurde durch das Vorhandensein von intrazellär zurückgehaltenem Interferon- γ oder Tumor – Nekrose – Faktor - α (TNF α) nachgewiesen.

35

Herstellung der Peptide

Die Synthese von Peptiden oder Peptidderivaten ist an einem Multiplen
5 Peptidsynthesizer (MPS) AMS 422 von ABIMED (Langenfeld) ausführbar (H.
GAUSEPOHL et al. (1992) Peptide Research 5/6: 315 - 320).

Für die Peptidsynthese können als feste Träger gehärtete Zellulose (Whatman 540;
Katalog Nummer 1540917) der Firma Whatman (Maidstone, Großbritannien) und
Polystyrolharz Tenta Gel SRAM (Kapazität 0,25 meq/g) der Firma Rapp Polymere
10 (Tübingen, Deutschland) benutzt werden.

Ausführlich ist die Festphasen Peptidsynthese beschrieben in Rudolf Volkmer- Engert,
Berit Hoffmann and Jens Schneider-Mergener, (1997) Stable Attachement of the HMB-
Linker to Continuous Cellulose Membranes for Parallel Solid Phase Spot Syntheses,
Tetrahedron Letter, Vol. 38,6; pp 1029 - 1032.

Patentansprüche:

1. Peptide oder Peptidderivate davon, aus der folgenden Gruppe mit der Sequenz:

- 5 R_N - Gln Thr Met Leu Arg Lys Glu Val Asn Ser Gln Leu Ser Leu Gly - R_C
R_N - Cys Asn Glu Asn Pro Glu Lys Asp Val Leu Ala Glu Leu Val Lys - R_C
R_N - Leu Val Lys Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val Arg His Arg- R_C
R_N - Ala Ala Asn Lys Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Lys Ala Arg Ala - R_C
R_N - Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met- R_C
- 10 R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met- R_C
R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu- R_C
R_N - Val Thr Ser Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser- R_C
R_N - Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser- R_C
R_N - Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile- R_C
- 15 R_N - Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn - R_C
R_N - Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile - R_C
R_N - His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly - R_C
R_N - Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu Leu Cys Pro- R_C
R_N - Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe- R_C
- 20 R_N - Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly - R_C
R_N - Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Trp- R_C
R_N - Val Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile- R_C
R_N - Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr- R_C
R_N - Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val- R_C
- 25 R_N - Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile - R_C
R_N - Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu - R_C
R_N - Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr- R_C
R_N - Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala- R_C
R_N - Glu Asp Val Pro Ser Glu Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu Gly - R_C
- 30 R_N - Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu - R_C
R_N - Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu - R_C
R_N - Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu - R_C
R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met- R_C
R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr - R_C
- 35 R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C

18

 $R_N - Asp\ Glu\ Glu\ Glu\ Ala\ Ile\ Val\ Ala\ Tyr\ Tyr\ Leu\ Ala\ Thr\ Ala\ Gly - R_C$

oder

 $R_N - Glu\ Asn\ Ser\ Asp\ Gln\ Glu\ Glu\ Ser\ Glu\ Gln\ Ser\ Asp\ Glu\ Glu\ Glu - R_C$

dabei steht

5 R_N für -H oder eine Amino - Schutzgruppe oder mindestens eine weitere Aminosäure außerhalb des Peptids oder Peptidderivats, R_C für -OH oder eine Carboxyl - Schutzgruppe oder mindestens eine weitere Aminosäure außerhalb des Peptids oder Peptidderivats,

wobei die Peptid - Derivate eine Deletion, Insertion oder Substituierung von ein, zwei

10 oder drei Aminosäuren der zuvor genannten Sequenzen aufweisen, oder

die Sequenz bis auf neun zusammenhängende Aminosäuren gekürzt wird, wobei die Deletion N - terminal und / oder C - terminal ist,

wobei die Peptidderivate im wesentlichen die Funktion eines der zuvor ausdrücklich aufgeführten Peptide

15 Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu

Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu

Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu

Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr

20 Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

Gln Thr Met Leu Arg Lys Glu Val Asn Ser Gln Leu Ser Leu Gly

Cys Asn Glu Asn Pro Glu Lys Asp Val Leu Ala Glu Leu Val Lys

Leu Val Lys Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val Arg His Arg

Ala Ala Asn Lys Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Lys Ala Arg Ala

25 Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu

Val Thr Ser Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser

Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Thr Ser

30 Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile

Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn

Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile

His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly

Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu Leu Cys Pro

35 Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe

Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly

19

Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Trp
Val Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile
Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr
Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val
5 Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile
Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu
Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr
Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala
Glu Asp Val Pro Ser Glu Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu Gly
10 Asp Glu Glu Ala Ile Val Ala Tyr Tyr Leu Ala Thr Ala Gly

oder

Glu Asn Ser Asp Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Glu
(jede der vorherigen Sequenzen = Referenzsequenz)

besitzen, in CD8⁺ T Zellen, insbesondere von mit HCMV immunisierten
15 Personen mit geeignetem HLA-Typ, die Produktion von Interferon- γ oder TNF- α zu induzieren.

2. Fragmente von Peptiden oder Peptidderivaten nach Anspruch 1, wobei die Fragmente Nonamere sind, die darin bestehen, daß eine längere Sequenz nach

20 Anspruch 1 bis auf neun zusammenhängende Aminosäuren gekürzt wird, wobei die Deletion N – terminal und / oder C – terminal ist und wobei die Funktion von wenigstens einem Peptid aus der Gruppe der Referenzsequenzen im Wesentlichen von dem Nonamer dabei erfüllt wird.

25 3. Peptide oder Peptidderivate nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei

R_N für -H oder eine Amino-Schutzgruppe

und

R_C für -OH oder eine Carboxyl-Schutzgruppe steht.

30 4. Peptide oder Peptidderivate nach Anspruch 3, wobei die Reste stehen:

R_N für -H oder eine Acylgruppe

und

R_C für -OH oder Amino-Gruppe.

35 5. Peptide oder Peptidderivate nach Anspruch 4, wobei die Reste stehen:

R_N für -H

20

und
R_c für -OH.

6. Peptide oder Peptidderivate nach einem der vorherigen Ansprüche als
5 Medikament oder Diagnostikum.

7. Verwendung eines Peptides oder Peptidderivates nach einem der vorherigen
Ansprüche zur Herstellung eines Medikaments zur Vakzinierung gegen HCMV
Infektionen.

10 8. Verwendung eines Peptides oder Peptidderivates nach einem der Ansprüche 1
bis 6 zur Herstellung eines Diagnostikums zur Identifizierung einer Reaktion des
zellulären Immunsystems gegen HCMV.

15 9. Verwendung eines Peptides oder Peptidderivates nach einem der Ansprüche 1
bis 6 zur Herstellung eines Diagnostikums zur Quantifizierung einer Reaktion des
zellulären Immunsystems gegen HCMV.

10. DNA, welche für eine der Aminosäuresequenzen und deren Derivate nach
20 einem der Ansprüche 1 bis 5 kodiert.

11. Vektoren oder Plasmide, in welche die DNA nach Anspruch 10 eingebaut ist.

12. DNA, Plasmid oder Vektor nach Anspruch 10 oder 11 als Medikament.

25

1 / 6

Sequenzprotokoll:**(1) ALLGEMEINE ANGABEN****(i) ANMELDER:**

- (A) NAME: Florian KERN
5 (B) STRASSE: Wolliner Straße 9
(C) ORT: 10435 BERLIN
(E) LAND: DEUTSCHLAND
(F) POSTLEITZAHL: 10435

10 (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Peptide zur Vakzinierung gegen das humane CMV

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 33 Sequenzprotokolle

(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG

(A) DATENTRÄGER: DISKETTE

15 (B) COMPUTER: Pentium/INTEL

(C) BETRIEBSSYSTEM: WINDOWS

(D) SOFTWARE: WINWORD;

20 (v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG: Prioritätsbelege vom 4.6.1999 (199 27 039.2) und 7.9.1999 (199 43 702.5).

Anmeldetag dieser Anmeldung 2.6.2000

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 1:**(i) SEQUENZKENNZEICHEN**

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

25 ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 1:

Gln Thr Met Leu Arg Lys Glu Val Asn Ser Gln Leu Ser Leu Gly

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 2:**(i) SEQUENZKENNZEICHEN**

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

35 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 2:

Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 3:**(i) SEQUENZKENNZEICHEN**

40 SEQUENZLÄNGE: 10 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 3:

Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

45

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 4:**(i) SEQUENZKENNZEICHEN**

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

50

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 4:

Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu

2 / 6

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 5:

Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser

10 (2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

15 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 6:

Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

20 SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 7:

Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu

25 (2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

30 MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 8:

Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 9:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 9:

40 Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

45 ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 10:

Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr

3 / 6

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

5 MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 11:

Cys Asn Glu Asn Pro Glu Lys Asp Val Leu Ala Glu Leu Val Lys

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 12:

10 (i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 12:

15 Leu Val Lys Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val Arg His Arg

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

20 ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 13:

Ala Ala Asn Lys Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Lys Ala Arg Ala

25

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 10 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

30 MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 14:

Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met

35

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

40

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 15:

Val Thr Ser Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Ile Ser

45 (2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 16:

50

Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile

4 / 6

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 17:

Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 18:

Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 19:

His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 20:

Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu Leu Cys Pro

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 21:

Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMAL: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 22:

Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly

5 / 6

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

5 MERKMALE:

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 23:

Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Trp

10 (2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMALE:

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 24:

15 Val Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

20 ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMALE:

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 25:

Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr

25 (2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMALE:

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 26:

30 Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 27:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

35 SEQUENZLÄNGE: 9 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMALE:

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 27:

40 Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 28:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

45 MERKMALE:

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 28:

Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu

6 / 6

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

5 MERKMALE: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 29:

Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr

10 (2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 30:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMALE: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 30:

15 Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 31:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

20 ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMALE: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 31:

Glu Asp Val Pro Ser Glu Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu Gly

25 (2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMALE: Vakzine gegen HCMV

30 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 32:

Asp Glu Glu Glu Ala Ile Val Ala Tyr Tyr Leu Ala Thr Ala Gly

(2) ANGABEN ZU SEQ. ID. NO: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN

35 SEQUENZLÄNGE: 15 Aminosäuren

ART DER SEQUENZ: Aminosäure-Sequenz

MERKMALE: Vakzine gegen HCMV

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ. ID. NO: 33:

Glu Asn Ser Asp Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Glu

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. Dezember 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/75180 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/045,
A61K 39/25, C12N 15/38, 15/63, G01N 33/68

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: KERN, Florian [DE/DE]; Wolliner Strasse 9,
D-10435 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01854

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmelddatum:
2. Juni 2000 (02.06.2000)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VOLK, Hans-Dieter [DE/DE]; Rathausstrasse 11, D-10178 Berlin (DE). REINKE, Petra [DE/DE]; Rathausstrasse 11, D-10178 Berlin (DE). FAULHABER, Nicole [DE/DE]; Fasanenstrasse 15, D-47509 Rheydt (DE). SUREL, Ingolf-Pascal [DE/DE]; Marie-Curie-Allee 16, D-10315 Berlin (DE). KHATAMZAS, Elham [IR/DE]; Christburger Strasse 41, D-10405 Berlin (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PEPTIDES FOR VACCINATING AGAINST HUMAN CMV

(54) Bezeichnung: PEPTIDE ZUR VAKZINIERUNG GEGEN DAS HUMANE CMV

(57) Abstract: The invention relates to peptides which are optionally fragments of the IE-1 or pp65 protein selected from the following group having sequence R_N - Gln Thr Met Leu Arg Lys Glu Val Asn Ser Gln Leu Ser Leu Gly - R_C; R_N - Cys Asn Glu Asn Pro Glu Lys Asp Val Leu Ala Glu Leu Val Lys - R_C; R_N - Leu Val Lys Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val Arg His Arg - R_C; R_N - Ala Ala Asn Lys Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Lys Ala Arg Ala - R_C; R_N - Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu - R_C; R_N - Val Thr Ser Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser - R_C; R_N - Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser - R_C; R_N - Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile - R_C; R_N - Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn - R_C; R_N - Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile - R_C; R_N - His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly R_C; R_N - Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu Leu Cys Pro - R_C; R_N - Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe - R_C; R_N - Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly - R_C; R_N - Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Trp - R_C; R_N - Val Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile - R_C; R_N - Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr - R_C; R_N - Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val - R_C; R_N - Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile - R_C; R_N - Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu - R_C; R_N - Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr - R_C; R_N - Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala - R_C; R_N Glu Asp Val Pro Ser Glu Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu Gly - R_C; R_N - Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu - R_C; R_N - Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu - R_C; R_N - Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu - R_C; R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Asp Glu Glu Ala Ile Val Ala Tyr Tyr Leu Ala Thr Ala Gly - R_C or R_N - Glu Asn Ser Asp Gln Glu Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Glu - R_C, whereby R_N represents -H or an amino protecting group; R_C represents -OH or a carboxyl protecting group. The inventive peptides are used in the preparation of a medicaments for vaccination against HCMV infections or a diagnostic reagent for identifying an immune response against HCMV.

A3

WO 00/75180

(57) Zusammenfassung: Peptide, die gegebenenfalls Fragmente des IE-1 oder pp65 Proteins sind, aus der folgenden Gruppe mit der Sequenz: R_N - Gln Thr Met Leu Arg Lys Glu Val Asn Ser Gln Leu Ser Leu Gly - R_C; R_N - Cys Asn Glu Asn Pro Glu Lys Asp Val Leu Ala Glu Leu Val Lys - R_C; R_N - Leu Val Lys Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val Arg His Arg - R_C; R_N - Ala Ala Asn Lys Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Lys Ala Arg Ala - R_C; R_N - Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn Ile Glu - R_C; R_N - Val Thr Ser Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser - R_C; R_N - Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Thr Ser - R_C; R_N - Met Ser Ile Tyr Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile - R_C; R_N - Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn - R_C; R_N - Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile - R_C; R_N - His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly R_C; R_N - Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu Leu Cys Pro - R_C; R_N

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
 LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
 PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
 UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:**

26. Juli 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("*Guidance Notes on Codes and Abbreviations*") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

- Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe - R_C; R_N - Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly - R_C; R_N - Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Trp - R_C; R_N - Val Cys Ser Met Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile - R_C; R_N - Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr - R_C; R_N - Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val - R_C; R_N - Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile - R_C; R_N - Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val Leu - R_C; R_N - Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr - R_C; R_N - Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val His His Tyr Pro Ser Ala Ala - R_C; R_N Glu Asp Val Pro Ser Glu Lys Leu Phe Met His Val Thr Leu Gly - R_C; R_N - Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu - R_C; R_N - Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu - R_C; R_N - Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu - R_C; R_N - Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met - R_C; R_N - Asp Glu Glu Ala Ile Val Ala Tyr Tyr Leu Ala Thr Ala Gly - R_C oder R_N - Glu Asn Ser Asp Gln Glu Ser Glu Glu Ser Asp Glu Glu Glu - R_C dabei steht R_N für -H oder eine Amino-Schutzgruppe; R_C für -OH oder eine Carboxyl- Schutzgruppe. Die erfindungsgemäßen Peptide werden zur Herstellung eines Medikaments zur Vakzinierung gegen HCMV-Infektionen oder eines Diagnostikums zur Identifizierung einer Immunantwort gegen HCMV verwendet.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No
PCT/DE 00/01854

| | |
|-------------------------------------|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | IPC 7 C07K14/045 A61K39/25 C12N15/38 C12N15/63 G01N33/68 |
|-------------------------------------|--|

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K C12N G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, STRAND, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | WO 94 00150 A (HOPE CITY ; ZAIA JOHN A (US); PANDE HEMA (US); RIGGS ARTHUR D (US)) 6 January 1994 (1994-01-06) siehe Seq ID Nr. 4 page 7, last paragraph -page 8, paragraph 1; claims 1-4,11; examples --- | 1-3,5-9 |
| X | WO 99 19349 A (HOPE CITY) 22 April 1999 (1999-04-22) siehe Seq ID Nr 19 claims; examples --- | 1-3,5-11 |
| X | WO 98 26074 A (DAVIGNON JEAN LUC ; DAVRINCHE CHRISTIAN (FR); INST NAT SANTE RECH M) 18 June 1998 (1998-06-18) siehe Peptid V20Q in Figur 4. page 3, line 13 -page 4, line 6; claims; figure 4; examples --- | 1,3,5-9 |
| | -/- | |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 January 2001

Date of mailing of the international search report

31/01/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | |
|-----------------|--------------------|
| Interr | nal Application No |
| PCT/DE 00/01854 | |

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | DE 196 19 255 A (KHATTAB BARBARA DR ;LINK HARTMUT PROF DR (DE)) 28 November 1996 (1996-11-28) the whole document --- | 1, 3, 5-9 |
| X | WO 99 02183 A (SIMARD JOHN J L ;CTL IMMUNOTHERAPIES CORP (CA); KUENDIG THOMAS M () 21 January 1999 (1999-01-21) siehe Seq ID Nr. 144 claims; examples ----- | 1, 3, 5-9 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| | |
|-----------------|--------------------|
| Interr | nal Application No |
| PCT/DE 00/01854 | |

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|---------|---|------------------|
| WO 9400150 A | 06-01-1994 | CA | 2117181 | A | 06-01-1994 |
| | | AU | 675204 | B | 30-01-1997 |
| | | AU | 2297292 | A | 24-01-1994 |
| | | EP | 0605432 | A | 13-07-1994 |
| | | JP | 6510799 | T | 01-12-1994 |
| WO 9919349 A | 22-04-1999 | US | 6156317 | A | 05-12-2000 |
| | | AU | 7481498 | A | 03-05-1999 |
| | | EP | 0946592 | A | 06-10-1999 |
| | | EP | 1023319 | A | 02-08-2000 |
| | | US | 6074645 | A | 13-06-2000 |
| WO 9826074 A | 18-06-1998 | WO | 9821233 | A | 22-05-1998 |
| | | FR | 2757169 | A | 19-06-1998 |
| | | AU | 5489298 | A | 03-07-1998 |
| | | EP | 0951554 | A | 27-10-1999 |
| | | NONE | | | |
| DE 19619255 A | 28-11-1996 | AU | 8568998 | A | 08-02-1999 |
| | | EP | 1003548 | A | 31-05-2000 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen
PCT/DE 00/01854

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07K14/045 A61K39/25 C12N15/38 C12N15/63 G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07K A61K C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, STRAND, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | WO 94 00150 A (HOPE CITY ; ZAIA JOHN A (US); PANDE HEMA (US); RIGGS ARTHUR D (US)) 6. Januar 1994 (1994-01-06) siehe Seq ID Nr. 4 Seite 7, letzter Absatz -Seite 8, Absatz 1; Ansprüche 1-4,11; Beispiele --- | 1-3,5-9 |
| X | WO 99 19349 A (HOPE CITY) 22. April 1999 (1999-04-22) siehe Seq ID Nr 19 Ansprüche; Beispiele --- | 1-3,5-11 |
| X | WO 98 26074 A (DAVIGNON JEAN LUC ; DAVRINCHE CHRISTIAN (FR); INST NAT SANTE RECH M) 18. Juni 1998 (1998-06-18) siehe Peptid V20Q in Figur 4. Seite 3, Zeile 13 -Seite 4, Zeile 6; Ansprüche; Abbildung 4; Beispiele --- | 1,3,5-9 |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *' A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *' E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist
- *' L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *' O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *' P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *' T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *' X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *' Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *' &* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24. Januar 2001

31/01/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interr. nales Aktenzeichen
PCT/DE 00/01854

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | DE 196 19 255 A (KHATTAB BARBARA DR ;LINK HARTMUT PROF DR (DE)) 28. November 1996 (1996-11-28) das ganze Dokument ----- | 1,3,5-9 |
| X | WO 99 02183 A (SIMARD JOHN J L ;CTL IMMUNOTHERAPIES CORP (CA); KUENDIG THOMAS M () 21. Januar 1999 (1999-01-21) siehe Seq ID Nr. 144 Ansprüche; Beispiele ----- | 1,3,5-9 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internes Aktenzeichen

PCT/DE 00/01854

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | | Datum der Veröffentlichung |
|---|----------------------------|--------------------------------|-----------|----------------------------|
| WO 9400150 A | 06-01-1994 | CA | 2117181 A | 06-01-1994 |
| | | AU | 675204 B | 30-01-1997 |
| | | AU | 2297292 A | 24-01-1994 |
| | | EP | 0605432 A | 13-07-1994 |
| | | JP | 6510799 T | 01-12-1994 |
| WO 9919349 A | 22-04-1999 | US | 6156317 A | 05-12-2000 |
| | | AU | 7481498 A | 03-05-1999 |
| | | EP | 0946592 A | 06-10-1999 |
| | | EP | 1023319 A | 02-08-2000 |
| | | US | 6074645 A | 13-06-2000 |
| | | WO | 9821233 A | 22-05-1998 |
| WO 9826074 A | 18-06-1998 | FR | 2757169 A | 19-06-1998 |
| | | AU | 5489298 A | 03-07-1998 |
| | | EP | 0951554 A | 27-10-1999 |
| DE 19619255 A | 28-11-1996 | KEINE | | |
| WO 9902183 A | 21-01-1999 | AU | 8568998 A | 08-02-1999 |
| | | EP | 1003548 A | 31-05-2000 |